

Mimetic peptides for epitope of apolipoprotein B-100, concatemer and modified peptides, and vaccine composition comprising same

Publication number: CN1392798 (A)

Publication date: 2003-01-22

Inventor(s): HYO-JOON KIM [KR]; HAE-JUNG JOUNG [KR] +

Applicant(s): HYO-JOON KIM [KR] +

Classification:




- international: C12N15/09; A61K9/08; A61K9/10; A61K9/12; A61K9/14; A61K9/16; A61K9/20; A61K9/48; A61K38/04; A61K39/00; A61P3/04; A61P3/06; A61P43/00; C07K7/00; C07K7/04; C07K14/47; C07K14/775; C12N15/12; C12N15/63; C12P21/02; C12N15/09; A61K9/08; A61K9/10; A61K9/12; A61K9/14; A61K9/16; A61K9/20; A61K9/48; A61K38/04; A61K39/00; A61P3/00; A61P43/00; C07K7/00; C07K14/435; C12N15/12; C12N15/63; C12P21/02; (IPC1-7): A61K39/00

- European: C07K14/775

Application number: CN20018003057 20010904

Priority number(s): KR20000052055 20000904; KR20010054005 20010904

Also published as:

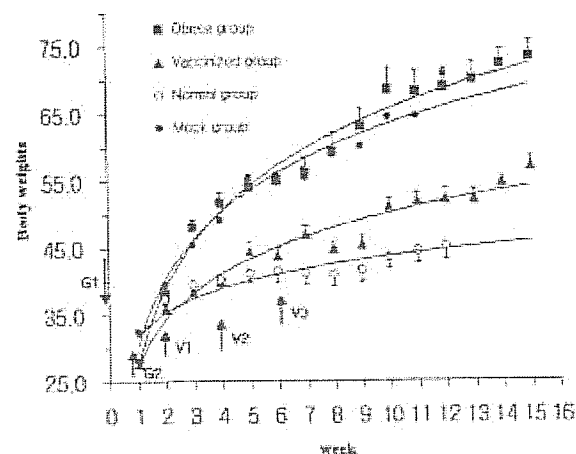
 CN1231262 (C)
 WO0220040 (A1)
 US2003211997 (A1)
 US6825318 (B2)
 SK6312002 (A3)

more >>

Abstract not available for CN 1392798 (A)

Abstract of corresponding document: **WO 0220040 (A1)**

The present invention relates to vaccine compositions for treatment of obesity. More particularly, the present invention is directed to mimetic for epitope of apolipoprotein B-100, concatemer and modified peptides thereof, and the vaccine composition comprising the same.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01803057.2

[43] 公开日 2003 年 1 月 22 日

[11] 公开号 CN 1392798A

[22] 申请日 2001.9.4 [21] 申请号 01803057.2

[30] 优先权

[32] 2000.9.4 [33] KR [31] 2000/0052055

[32] 2001.9.4 [33] KR [31] 2001/0054005

[86] 国际申请 PCT/KR01/01492 2001.9.4

[87] 国际公布 WO02/20040 英 2002.3.14

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.7

[71] 申请人 金晓骏

地址 韩国京畿道

[72] 发明人 金晓骏 丁海重

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

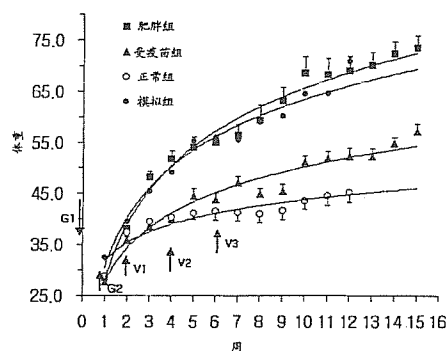
代理人 范征

权利要求书 2 页 说明书 14 页 序列表 5 页
附图 12 页

[54] 发明名称 载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽,以及含有这些肽的疫苗组合物

[57] 摘要

本发明涉及用来治疗肥胖的疫苗组合物。更具体地说,本发明涉及载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽,以及包含这些肽的疫苗组合物。



ISSN 1008-4274

1. 一种如 SEQ ID NO:1 所示的载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽及其多联体。
2. 根据权利要求 1 所述的模拟肽的多联体, 其中所述多联体包含 1-15 个所述模拟肽。
3. 根据权利要求 1 所述的模拟肽的多联体, 其中所述多联体包含 4 个串联连接的所述模拟肽。
4. 根据权利要求 1 所述的模拟肽及其多联体, 其中所述模拟肽的氨基酸序列用选自增加、缺失和化学取代的方法来进行修饰。
5. 一种如 SEQ ID NO:2 所示的载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽。
6. 根据权利要求 5 所述的模拟肽, 其中所述多联体包含 1-15 个所述模拟肽。
7. 根据权利要求 5 所述的模拟肽多联体, 其中所述多联体包含 4 个串联连接的所述模拟肽。
8. 根据权利要求 5 所述的模拟肽, 其中所述模拟肽的氨基酸序列用选自增加、缺失和化学取代的方法来修饰。
9. 一种如 SEQ ID NO: 3 所示的载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽。
10. 根据权利要求 9 所述的模拟肽的多联体, 其中所述多联体包含 1-15 个所述模拟肽。
11. 根据权利要求 9 所述的模拟肽的多联体, 其中所述多联体包含 4 个串联连接的所述模拟肽。
12. 根据权利要求 9 所述的模拟肽, 其中所述模拟肽的氨基酸序列用选自增加、缺失和化学取代的方法来进行修饰。
13. 一种治疗肥胖的疫苗组合物, 它包含选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽的肽以及这些肽的混合物。
14. 根据权利要求 13 所述的疫苗组合物, 所述疫苗组合物用皮内注射来给药。
15. 根据权利要求 13 所述的疫苗组合物, 其中所述疫苗组合物的类型选自片剂、丸剂、颗粒剂、扁囊剂、酞剂、悬浮剂、乳剂、溶液、糖浆、气溶胶、软或硬的明胶胶囊、可注射的无菌液体和无菌粉末。
16. 一种制备载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽的方法, 该方法包括
 - i)将编码 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的载脂蛋白 B-100 表

位的模拟肽、其多联体和修饰肽的遗传信息的 DNA 插入载体的步骤;

ii)用步骤 i)所得载体转化宿主细胞并培育该宿主细胞的步骤;

iii)从宿主细胞中分离出所述载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽的步骤。

5 17. 一种 DNA, 它编码由 4 个 SEQ ID NO:1 所示的载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽串联连接组成的多肽。

18. 一种表达载体, 它包含编码由 4 个 SEQ ID NO:1 所示的载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽串联连接组成的多肽的 DNA 片段。

5 载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽，
以及含有这些肽的疫苗组合物

技术领域

本发明涉及一种治疗肥胖的疫苗组合物。更具体地说，本发明涉及一种包含载脂蛋白 B-100 的模拟肽表位、其多联体和修饰肽的疫苗组合物。

10

背景技术

血清脂质由胆固醇、甘油三酯(TG)、游离脂肪酸、磷脂等组成，其在血流中以脂质与载脂蛋白的复合物—脂蛋白形式存在。

15 在这些脂蛋白中，低密度脂蛋白(LDL)是 TG 和胆固醇的主要载体。由于饮食生活或其它因素的变化，由血液中 LDL-胆固醇水平升高引起的动脉硬化、冠状动脉疾病或心肌梗塞的患者数量已有显著增加。

因此，现已进行各种研究来降低 LDL-胆固醇的水平和显示上述疾病的病因，以治疗患有上述疾病的患者。

20 LDL-胆固醇是与脂质有关的成年疾病的主要病因，它可由巨噬细胞转变成高密度脂蛋白(HDL)的形式。另外，在肝脏中，LDL-胆固醇也可转变成其它物质或转变成胆汁酸形式(Brown, M.S.和 Goldstein, J.L., 1983, Annu. Rev. Biochem., 52:223-261)。

25 载脂蛋白 B-100 是 LDL 中的主要蛋白部分，它也存在于非常低密度的脂蛋白(VLDL)和乳糜微粒中。当血液中通过识别载脂蛋白 B-100 诱导产生抗体时，血中的 LDL-胆固醇可通过巨噬细胞的吞噬作用来除去，因为载脂蛋白 B-100 介导 LDL 颗粒与显露在细胞表面上的 LDL-受体结合(Dalum I., 等人., 1997, Mol. Immunol., 34(16-17):1113-20)。

30 当诸如抗体等大分子已经和 LDL 表面上的载脂蛋白 B-100 结合时，由于与载脂蛋白 B-100 结合的大分子引起的空间位阻，诸如脂蛋白脂肪酶等脂肪酶不能水解 TG 等。因此，可利用结合载脂蛋白 B-100 的抗体来抑制肥胖的主要因素—游离脂肪酸的形成。

最近，已经在诸如小鼠和家兔等各种动物模型中进行了几个用疫苗来降低 LDL-胆固醇水平和抑制动脉硬化发生的研究。例如，C.R. Alving 报道说，胆固醇可通过代

谢或氧化来修饰,经修饰的胆固醇在某些情况下是强的抗原决定簇(Alving, C.R., 等人, 1989, Biochem. Soc. Trans., 17(4): 637-9; Alving, C.R., 等人, 1996, J. Lab. Clin. Med. , 127: 40-49; Alving, C.R., 等人, 1996, Curr. Top. Microbiol. Immunol. , 210: 181-6)。

另外,已经报道血清中存在胆固醇的内源性抗体(Wu, J.T., L.L., 1997, Clin. Lab. Med., 17(3): 595-604, 综述)。还有报道说,通过喂食含胆固醇的食物在家兔体内诱导动脉硬化和高胆固醇血症的实验中,通过注射含胆固醇的脂质体而免疫的家兔体内的高胆固醇血症和动脉硬化与对照组相比受到遏制或显著降低。

胆固醇疫苗诱导的这些抗体是结合 VLDL、中密度脂蛋白(IDL)和 LDL 的免疫球蛋白 M(IgM)。根据上述内容,据信可以用疫苗来治疗或预防高水平胆固醇引起的高脂血症或动脉硬化(Bailey, J.M., 1994, Science, 264: 1067-1068; Palinski, W. 等人, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92(3): 821-5; Wu, R. et al, 1999, Hypertension, 33(1): 53-9)。

本发明者已经发现载脂蛋白 B-100 的模拟肽表位可有效预防肥胖,基于上述发现,本发明者开发出了用来治疗肥胖的疫苗组合物。

15

发明揭示

因此,本发明的目的是提供载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽,其多联体和修饰肽。

本发明的另一目的是提供一种制备上述载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽及其多联体和修饰肽的方法。

20 本发明还有一个目的是提供一种治疗或预防肥胖的药物组合物,该组合物含有上述载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽及其多联体和修饰肽。

本发明的目的可通过提供载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽及其多联体和修饰肽来实现。

25 为了筛选单克隆抗体(MabB23)结合的人载脂蛋白 B-100 的表位,在本发明中采用噬菌体的肽文库系统。上述筛选出的肽是在结构上与可被抗体识别的抗原决定簇相似的模拟肽,这些模拟肽可根据所筛选的肽的氨基酸序列来合成。

肽文库系统是一种搜寻抗原决定簇的三维形式的方法。即,将编码随机序列的肽的 DNA 片段插入编码噬菌体次要外壳蛋白的 DNA 中,然后将上述 DNA 插入读框(RF)DNA 中,转化大肠杆菌,以使它们表达。为了筛选在结构上与抗原决定簇相似
30 的肽,使大肠杆菌表面上表达的肽与抗原反应。

为了制备抗血清,导入上述模拟肽来免疫小鼠。经确认,如此获得的抗血清同时识别最初的载脂蛋白 B-100、模拟肽和 LDL(“用噬菌体展示的随机肽文库鉴定针对

形剂或稀释剂。

另外，本发明组合物还可包含填充剂、抗粘合剂、润滑剂、润湿剂、香料、乳化剂和抗菌剂。

5 本发明的组合物可用本领域熟知的常规方法来配制，通过一次或多次接种在哺乳动物体内诱导产生免疫应答。

本发明的用来治疗肥胖的疫苗组合物可通过诸如口服、皮肤、皮内、静脉或肌肉等各种途径(较佳的是皮内给药)来给药。

10 本发明的疫苗组合物的有效剂量为 0.1-10 微克(活性肽)千克体重，较佳的为 0.5-1.0 微克/千克体重。然而，疫苗组合物的活性组分的实际剂量可根据免疫力状况、给药途径、患者状况、年龄、性别、体重等几个因素来决定。因此，所述剂量范围不以任何方式局限于本发明的范围。

本发明的疫苗组合物的主要药效是预防或治疗肥胖，其机理是由模拟肽或其多联体或修饰肽诱导产生的人抗体结合在 LDL 表面上载脂蛋白 B-100 的表位上，从而在空间上阻碍并抑制脂肪酶产生脂肪酸(肥胖的主要病因)。

15 另外，本发明的疫苗组合物还有抑制高脂血症的效果，其机理是模拟肽、其多联体或修饰肽诱导的偶联于 LDL 表面上载脂蛋白 B-100 表位上的人抗体引起调理作用，通过该调理作用，LDL 很容易被检测到并被巨噬细胞除去。

20 本发明组合物的另一药物效果是通过抑制胆固醇和游离脂肪酸等脂质在细胞内的累积来预防或治疗肥胖，其机理是本发明的模拟肽、多联体或修饰肽诱导的人抗体与 LDL 表面上的载脂蛋白 B-100 表位结合，从而抑制 LDL 与外露在细胞表面上的 LDL 受体特异性结合。

附图简述

25 通过参照附图详细描述其较佳实施方案，本发明的上述目的和其它优点将更为明了，在附图中：

图 1a 至 1d 表示用来表达本发明模拟肽的载体的结构和组成。图 1a 表示前导盒的结构，图 1b 表示 LB 盒的结构，图 1c 表示 BL 盒的结构，图 1d 表示 pBX4 表达载体的结构。

图 2 表示制备用于表达本发明模拟肽的 pBX1 和 pBX4 载体的步骤。

30 图 3 表示鉴定 LB 盒的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的结果。

图 4 表示用于鉴定插入质粒 pBlue-BL 的 BL 盒的 PAGE 结果。

图 5 表示用来确认插入质粒 pBX1 和 pBX3 的 DNA 的方向和拷贝数的 PAGE 结

载脂蛋白 A-1 和载脂蛋白 B-100 的鼠单克隆抗体的抗原决定簇”，Chi-Hoon Kim, Hanyang Univ., 1997)。

本发明的载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽可以是选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 的肽或是其混合物。

- 5 为了改进其抗原决定簇，本发明的模拟肽可以多联体形式使用。作为本发明的一个实施方案，两个或多个肽可相互连接。由 3-15 个肽组成的多联体是所希望的。更佳的，本发明的多联体包含四个 SEQ ID NO:1 的肽。

本发明的上述模拟肽的“多联体”指一种聚合物，其中上述模拟肽的末端相互连接。

- 10 本发明的上述模拟肽的“修饰肽”指可被载脂蛋白 B-100 的单克隆或多克隆抗体识别的模拟肽变体。这些变体包括对本发明的模拟肽中的一个或多个氨基酸进行置换、缺失、插入和化学取代。

- 本发明另一目的是提供一种制备模拟肽及其多联体和修饰肽的方法，该方法包括下列步骤：i)将编码上述模拟肽及其多联体和修饰肽的 DNA 插入载体内，ii)用上述载体转化宿主细胞，然后培养这些宿主细胞，iii)从上述宿主细胞中分离出上述模拟肽及其多联体或修饰肽。

- 疫苗组合物制剂可从本发明的模拟肽、其多联体或修饰肽通过任何常规方法来制得。在制备上述制剂的方法，组合物(其中活性化合物与免疫佐剂、增强免疫力的药物、载体、赋形剂和稀释剂混合)宜选自片剂、丸剂、颗粒剂、粉末剂、扁囊剂、悬浮剂、乳剂、液体、糖浆、气溶胶、软或硬的明胶胶囊、注射用无菌液体、无菌粉末等形式。

- 可用于本发明组合物的免疫佐剂是一种含有 T 细胞表位的蛋白质(例如乙型肝炎病毒的表面蛋白)，诸如铝盐、膨润土、乳液、丙烯酸颗粒等的惰性载体；疏水性抗原(如脂质)、水包油和油包水乳剂、贮存脂肪形成物(如多糖)、T 细胞激活剂如 PPD、聚腺嘌呤、聚尿嘧啶等；B 细胞激活剂(如 B 细胞促分裂素)、表面活性剂如皂素、溶血卵磷脂、视黄醛、quil A、脂质体等；增强巨噬细胞活性的材料；和补体旁途径激活剂如胰岛素、酵母多糖、内毒素、左旋咪唑、C. parvum 等。

本发明的“载体蛋白”指药学上可接受的能将本发明的模拟肽及其多联体和修饰肽输送通过血液的物质，如蛋白质或铝盐。

- 30 铝盐、苯氧乙基乙醇、水、生理盐水、乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖、甘露糖、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、无定形纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油可用作本发明组合物中的合适的载体、赋

果。

图 6 表示用来鉴定所表达的 PBI₄ 肽的 Western 印迹结果。

图 7 表示用来确认纯化的 PBI₄ 肽的十二烷基硫酸钠(SDS)PAGE 的结果。

图 8 表示用来确认所纯化的 PBI₄ 肽对抗 PBI₄ 血清的反应性的 Western 印迹结果。

5 图 9 表示用来测定 PBI₄ 肽诱导的小鼠抗体的亲和力的 ELISA 的结果。

图 10 的图表描述了 PBI₄ 对小鼠体重增加的抑制效果。

图 11a 和 11b 描述了小鼠体重变化取决于在注射破坏下丘脑的药物后 20 周内是否给予本发明的 PBI₄ 疫苗。

图 12 的图表表示 PBI₄ 疫苗的注射对血清中脂质浓度的影响。

10

实施发明的最佳方式

下面将更详细地描述本发明。然而，下面描述的本发明仅仅是为了说明本发明的实施方案，而不是限制本发明的范围。

实施例 1：寡核苷酸的合成和退火

15

寡核苷酸由 Genemed Synthesis Inc.(San Francisco, CA, USA)根据本发明者要求的序列来进行化学合成。为了使寡核苷酸 5'端磷酸化，使 50 微升 100 皮摩尔/微升寡核苷酸与 10 微升 10mM ATP、3 微升 10U/微升 T4 多核苷酸激酶 Takara, Otsu, Japan)以及 7 微升 10X 激酶缓冲液 37℃培育 2 小时。

20 混合每 10 微升等份的上述磷酸化寡核苷酸，80℃加热 5 分钟，然后非常缓慢地冷却至室温，在互补链之间退火成特异性的配对。

实施例 2：连接

25 混合 1 微升载体 DNA、5 微升插入物 DNA、1 微升 T4 DNA 连接酶(NEB, Beverly, MA, USA)、1 微升 10X 酶反应缓冲液(NEB, Beverly, MA)和 2 微升蒸馏水，制得混合物，然后在 16℃培育过夜，然后进行培育。

实施例 3：用来表达载脂蛋白 B-100 的模拟肽的 pBX 表达载体的构建

步骤 1：载体的设计

30 用来表达模拟肽的质粒载体通常包含前导盒和一个或多个 PB1 肽基因。如图 1 所示，将前导盒(图 1a)克隆到 pQE30 质粒(Qiagen, Hilden, Germany)的多克隆位点内，制得含有一个 PB1 的质粒 pBX1。用 HindIII 和 SalI 消化所得质粒，用 LB 盒(图 1b)代替小片段，得到便于插入多个 BL 盒(图 1c)的质粒 pBX1。

同时,用 SalI 和 XhoI 切割质粒 pBluescript II SK+,与随机发生一个或多个 BL 盒插入的 BL 盒连接。选择并切出质粒 pBlue-BL,亚克隆到 pBX1(图 1d)中。

步骤 2: 表达 PB1 单肽的载体的制备

使通过实施例 1 和 2 相同方法合成的 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 寡核苷酸退火,制得前导盒。然后,将经 SalI 和 BamHI 切割的 pQE30 载体(Qiagen, Hilden, Germany)与上述连接盒连接,制得 pQE 前导质粒。由于上述 pQE30 载体的表达,为使蛋白容易纯化,在表达的蛋白质 N 端额外插入 6 个组氨酸残基。设计上述前导盒,使其包含肠激酶的识别位点(DDDDKI; SEQ ID NO: 12),以将额外的氨基酸减少至最小值。

根据实施例 1 的方法,合成 4 个寡核苷酸(其序列用 SEQ ID NO:4-7 表示),使它们磷酸化,然后分别与互补的寡核苷酸退火,以便合成图 1b 的 LB 盒(SEQ ID NO: 13 和 14)。将 40 微升退火的寡核苷酸与 3 微升 1U/微升 T4 DNA 连接酶、5 微升 10X 酶缓冲液以及 2 微升蒸馏水一起混合,制得连接混合物。然后,培育连接混合物过夜,使寡核苷酸相互连接。

反应完成后,将反应混合物加载到 20%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。用溴化乙锭(EtBr)给凝胶染色,鉴定 LB 盒(52bp 寡核苷酸)。

在图 3 中,泳道 M 是 20bp DNA 梯序列标记,泳道 1 是反应溶液。用 QIAEX II 凝胶抽提试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)从凝胶获得 LB 盒。

用 Hind III 和 SalI 切割上述 pQE-前导序列,然后按照实施例 2 与上述 LB 盒连接,制得 PB1 模拟肽的表达载体。制得的表达载体命名为 pBX1,载体表达的肽命名为 PBI₁ 肽(参见图 2)。

步骤 3: PBI₁ 肽多联体的表达载体的制备

根据实施例 1 的方法,合成具有 SEQ ID NO:4、5、8 和 9 所示序列的四个寡核苷酸并磷酸化,然后分别与互补的寡核苷酸退火,以合成图 1c 所示的 BL 盒(SEQ ID NO: 15 和 16)。随后,象步骤 2 那样,使这些寡核苷酸相互连接,然后加样到 20%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。通过溴化乙锭凝胶染色,鉴定出 55bp 的寡核苷酸(前导盒)。用 QIAEX II 凝胶抽提盒从凝胶获得 BL 盒,然后用 SalI 和 XhoI 切割。

同时,用 SalI 和 XhoI 切割 pBluescript II SK(Stratagene, La Jolla, CA, USA)。载体在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳,然后用 QIAEX II 凝胶抽提盒(Qiagen, Hilden, Germany)来获得。

用 5 微升 BL 盒 DNA 和 1 微升上述切割载体 DNA 进行与实施例 2 相同的连接反应,获得 pBlue-BL 质粒。

用 SalI 和 XhoI 切割 pBlue-BL, 抽提该 BL 盒。将该 BL 盒插入步骤 2 中制得的 pBX1 载体的 SalI 位点内, 制得质粒 pBX2。另外, 将插入 pBX1 载体的 SalI 位点的 BL 盒数目从 2 改为 3(参见图 2), 制得 pBX3 和 pBX4。

pBX2、pBX3 和 pBX4 载体表达的肽是有 2-4 个 PB1 肽的多联体。它们分别命名
5 为 PBI₂、PBI₃ 和 PBI₄。

步骤 4: 插入物的鉴定

用 pBlue-BL 质粒转化宿主细胞(大肠杆菌 M15[pREP4]; Qiagen, Hilden, Germany), 然后涂在 1%琼脂板上, 37°C培育 16 小时, 使大肠杆菌菌落形成。将琼脂板上形成的一个菌落接种在 10 毫升 LB 培养基中, 37°C摇瓶培育 16 小时, 然后用
10 DNA 纯化系统(Wizard PLUS SV DNA miniprep DNA 纯化系统; Pormega, Madison, WI, USA)分离质粒。将从转化的大肠杆菌收获的质粒与 SalI 和 XhoI 限制酶一起培育, 使其在 37°C受切割 1 小时, 然后用 20%PAGE 分析(图 4)。在图 4 中, 泳道 M 表示 20 bp DNA 梯序列, 泳道 1 表示步骤 3 获得的寡核苷酸产物, 泳道 2 表示通过 20%PAGE 从步骤 3 分离的 BL 盒 DNA, 泳道 3 表示经限制酶处理的重组 pBlue-BL 质粒。如图
15 4 所示, 确认 pBlue-BL 质粒含有 BL 盒。

用 pBX1 或 pBX3 质粒转化大肠杆菌(M15[pREP4]), 如上所述分离质粒 DNA, 以确认 DNA 盒插入物的数目和方向。分离的质粒用 SalI 和 HindIII 限制酶切割, 用 20%PAGE 分析(图 5)。在图 5 中, 泳道 M 表示 20 bp DNA 梯序列, 泳道 1 和 3 表示含有 LB 但不是 BL 盒的 pBX1 质粒, 泳道 2 表示具有一个 LB 和两个 BL 盒(具有正
20 确方向)的质粒。另一方面, 泳道 4 表示了具有一个 LB 和两个 BL 盒(但有相反的方向)的质粒。如图 5 所示, 限制酶图谱能鉴定有多少 B 盒(BL 或 LB 盒)插入以及它们以何方向插入 pBX 载体。

另外, 从转化的大肠杆菌收获的质粒中所插入的 B 盒的 DNA 序列经确认与设计的序列相同。质粒用 Wizard PLUS DNA miniprep 试剂盒来制备, 用 Sequennase(2.1
25 版)DNA 测序试剂盒(Amersham, Cleveland, UK)来测序。

实施例 4: PBI₄ 肽在大肠杆菌中的表达及其纯化

步骤 1: PBI₄ 肽表达的确认

为了确认 PBI₄ 肽的表达, 在含有氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 琼脂肉汤上培育三
30 种转化的大肠杆菌 M15[pREP4]。一种大肠杆菌 M15[pREP4]用质粒 pBX4 转化, 另一种用 pQE30 作模拟转化, 还有一种是未转化的大肠杆菌 M15[pREP4]。将从固体培养物形成的每个菌落分别接种到含有 100 微升/毫升氨苄青霉素和 25 微升/毫升卡那霉素

的液体 LB 培养基中，培育过夜。37℃振摇培育该培养物 1 小时，直至 600nm 下的 O.D 值达到 0.5-0.7。随后，将 1mM 异丙基-硫代-β-半乳糖吡喃糖苷(IPTG)加入培养基中，以实现重组蛋白的表达，然后再在 37℃下培育 5 小时。取 1 毫升培养基，14000rpm 下离心 2 分钟，使细菌细胞沉淀。将细胞沉淀悬于 50 微升 2X SDS 溶液[100mM Tris-Cl
5 pH 6.8, 20%甘油(w/v), 4%SDS(w/v), 2% 2-巯基乙醇, 0.001%溴苯蓝]中，用于 SDS-PAGE 中。将悬浮的溶液加热至 95℃，加热 5 分钟，然后将 10 微升溶液加样到浇注凝胶孔上，在 20mA 下电泳 5 小时(Mighty Small II, Hoefer, USA)。浓缩胶和分离胶的丙烯酰胺浓度分别采用 5%和 15%，用预先染色的标准品 SeeBlue(250Kda 至 4kDa; NOVEX, San Diego, CA, USA)或范围宽的标准品 Mark12(200kDa 至 2.5kDa)作
10 为标准分子标记蛋白。电泳后，用考马斯亮蓝 R-250 染色 1 小时，染料用脱色液(5% 甲醇和 7%乙酸)脱色 10 小时。

为了确认所表达的蛋白质是 PBI₄ 肽，用抗 PB1 家兔抗体对电泳凝胶中的蛋白质进行 Western 印迹(图 6)。用 Bio-Synthesis, Inc.(Lewisville, TX, USA)化学合成的 PB1 肽偶联的卵白蛋白进行免疫，产生抗血清。在图 6 中，泳道 M 表示预先染色的标准
15 品 SeeBlue 标记，泳道 1 表示用来培育未转化的大肠杆菌 M15[pREP4]的培养基，泳道 2 表示用来培育经 pQE30 载体转化的大肠杆菌 M15[pREP4]的培养基，泳道 3 表示用来培育经 pBX4 载体转化的大肠杆菌 M15[pREP4]的培养基。

如图 6 所示，只有经 pBX4 转化的大肠杆菌表达的重组 PBI₄ 肽表现出与抗 PB1 小鼠血清有特异性免疫力。

20 步骤 2：表达的肽的溶解度的鉴别

用与步骤 1 相同的方法培育经 pBX4 载体转化的大肠杆菌 M15[pREP4]。取 10 毫升培养基，离心收获细胞。将细胞沉淀悬浮于 5 毫升细胞裂解液(300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 10mM 咪唑, pH 8.0)中，从细胞获得天然蛋白。冷却后，用超声波对沉淀悬浮的溶液进行 20 轮超声处理，以使细胞裂解。4℃、10000rpm 下离心 30 分
25 钟，取上清液。将相同体积的 2X SDS 溶液与该溶液混合，如步骤 1 中同一方法那样进行 SDS-PAGE。每一溶液在 95℃沸腾 5 分钟后，SDS-PAGE 确认从可溶的抽提物 A 中能分离纯化得到 PBI₄ 肽，因为它被包含不溶性粗抽提物 B 中。

步骤 3：PBI₄ 肽的纯化

步骤 3-1：亲和层析

30 用纯化 His-加尾的蛋白质的 Ni-NTA 树脂来纯化步骤 1 中的重组肽。利用树脂中的饱和的 Ni²⁺和所表达的蛋白质末端的组氨酸残基之间的吸引力的亲和层析是方便地纯化所述蛋白的熟知方法。

首先将经 pBX4 转化的大肠杆菌 M15[pREP4]接种到 1 升 LB 培养基中, 37℃ 培育至 600nm OD 值超过 0.6。LB 培养基与 pBX4 载体之比为 50: 1。加入 IPTG 至最终浓度为 1mM, 再次培育 5 小时。培育后, 6000xg 下离心培养基 30 分钟, 获得细胞沉淀, 将沉淀保藏于-70℃下过夜。使沉淀在冰中溶解, 悬浮于溶解溶液(300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 10mM 咪唑, pH 8.0)中, 其中每 1 克沉淀采用 5 毫升溶解溶液。用步骤 2 的方法通过超声处理使细胞裂解, 然后在室温下、10000Xg 下离心 30 分钟。加入与沉淀体积相同的缓冲液(8M 脲, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-HCl pH 8.0), 使细胞碎片重新悬浮, 并使其中的蛋白质变性, 用简单的超声波处理沉淀悬浮的溶液, 使更多的蛋白质溶解在缓冲液中。悬浮液于 8000rpm 下离心 30 分钟, 以除去未溶解在 8M 脲中的细胞碎片。在 4 毫升上述上清液中, 加入 4℃ 的 1 毫升 Ni-NTA 树脂, 200rpm 下振摇 2 小时, 以捕获含有 His-尾的蛋白质。

将含有蛋白质/Ni-NTA 复合物的该上清液仔细导入层析柱(大小为 2 厘米(内径)×2.7 厘米(高))中。在树脂沉降后, 打开塞帽, 使过量缓冲液滤干。用 20 毫升中性 pH 缓冲液(8M 脲, 0.1M NaH₂PO₄ 0.1M Tris-HCl pH 6.3)洗柱, 随后用 20 毫升另一缓冲液(8M 脲, 0.1M NaH₂PO₄ 0.01M Tris-HCl pH 6.3)洗柱, 以洗去与 Ni-NTA 树脂非特异性结合的蛋白质。倒入 5 毫升低 pH 缓冲液(8M 脲, 0.1M NaH₂PO₄ 0.1M Tris-HCl pH 5.9)两次, 随后倒入 5 毫升强酸缓冲液(8M 脲, 0.1M NaH₂PO₄ 0.1M Tris-HCl pH 4.5)4 次, 洗脱出含有 His-尾的目标蛋白, 然后用 SDS-PAGE, 用 15% 丙烯酰胺凝胶(图 7)来确认洗脱的目标蛋白。在图 7 中, 泳道 M 表示预先染色的 SeeBlue 分子大小标记物, 泳道 1 表示纯化的 PBI₄ 肽。

使上述纯化的蛋白质对 PBS(8 克/升氯化钠, 0.2 克/升氯化钾, 1.44 克/升 NaH₂PO₄ 和 0.24 克/升 KH₂PO₄)透析, 以重新获得它们最初的构型。所用的透析管的分子量截留大小为 3500Da。在透析期间, 前 5 小时先用 3 升含 2M 脲的 PBS, 然后用 5 升没有脲的 PBS 两次, 过夜。

25 步骤 3-2: 疏水层析

为了提高步骤 3-1 所得 PBI₄ 肽的纯度, 进行疏水层析。在步骤 3-1 中从 Ni-NTA 洗脱的含 PBI₄ 肽的溶液中逐量加入硫酸铵至最终浓度为 20%, 然后调节至 pH 7.0。在 10% 的硫酸铵完全溶化后使溶液静置 3 小时以上, 然后将溶液加样到苯基 sepharose 柱[填料: 苯基 sepharose Fast Flow 树脂(Pharmacia, Sweden);柱体积为 1 厘米(内径)×3 厘米(高度)]中。

在从 10% 到 0% 的硫酸铵的反向梯度下, 以 0.5 毫升/分钟将洗脱液(8M 脲, 0.1M NaH₂PO₄ 0.01M Tris-HCl pH 6.3)倒入柱内, 洗脱出各组分, 将各组分加样在凝胶上进

行 SDS-PAGE。收集含有 PBI₄ 肽的组分，在待脱盐的缓冲液中透析，同时除去用作变性剂的脲。

步骤 3-3: His-尾的除去

在适合用来除去纯化的 His-尾蛋白中的变性剂和咪唑等物质以及用来激活肠激酶的缓冲液(50mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂ pH 7.4)中加入 2M 脲。用上述含脲缓冲液使 PBI₄ 肽脱盐，对步骤 3-2 获得的透析的 PBI₄ 肽再次进行透析，在此期间，通过对不含脲的缓冲液进行反复透析来逐渐降低脲浓度。将 3U/毫升肠激酶加入含 PBI₄ 肽的溶液中，用所述第二缓冲液与该缓冲液交换，并在 23℃ 下培育。每小鼠取溶液进行 SDS-PAGE 分析，以检查有 His-尾的 PB1(PBI₄^{+his})肽中 His-尾的除去量。

10 步骤 3-4: 离子交换层析

用离子交换层析除去肠激酶处理后产生的不需要的蛋白质和肽。

在透析缓冲液(2M 脲, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-HCl, pH7.0)中对步骤 3-3 获得的含 PBI₄^{+his} 肽的溶液进行透析，充分交换缓冲液。将经过透析的溶液加样到 DEAE sepharose 树脂(Pharmacia, uppsala, Sweden)上。随后，用平衡缓冲液(50mM 磷酸钠缓冲液，2M 脲，pH 7.0)使该柱平衡，用另一缓冲液(50mM 磷酸钠缓冲液，2M 脲，1M 氯化钠)在氯化钠浓度梯度 0-1M 下进行洗脱(流速为 0.5 毫升/分钟)。回收每一组分，然后合并含有目标蛋白的组分。在浓缩各区室后，用 SDS-PAGE 确认 PBI₄^{+his} 肽的存在。

步骤 4: PBI₄ 的定量分析

20 用 micro BCA 试剂(Pierce, Rockford, USA)通过比色分析来定量分析用步骤 3 相同方法获得的纯化的 PBI₄ 肽。

步骤 5: 重组 PBI₄ 肽的特性确认

用 ECL(Amersham, Cleveland, UK)进行 Western 印迹试验，确认步骤 3 中纯化的 PBI₄ 肽的纯度，以及它们对用合成的 PBI₄ 肽作为抗原获得的抗血清的免疫原性。在 SDS-PAGE(实施例 2，步骤 1)后，使凝胶与 PVDF 膜一起在缓冲液(0.3% Tris, 1.5% 甘氨酸, 20% 甲醇)中在 60V 恒定电压下培育 3 小时，以使凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上。然后，使带印迹的膜与 5 毫升封闭液(TBS pH 7.5, 5% 脱脂奶粉(w/v), 0.02% 吐温 20)培育 1.5 小时，然后用 TTBS(含有 0.1% 吐温 20 的 Tris 缓冲的盐溶液)分别洗涤三次各 15 分钟、5 分钟和 5 分钟。用 TTBS 溶液以 1: 5000 的比例稀释抗肽 PB1(指实施例 2 的步骤 1)的抗血清，然后和膜一起培育 1.5 小时，以确认 PBI₄ 肽，抗 PBI₄ 肽的抗血清的纯度(实施例 3)。在用 TTBS 依次洗涤凝胶三次(15 分钟，5 分钟和 5 分钟)，使膜在室温下与一溶液一起培育 1.5 小时，该溶液中碱性磷酸酶-F(ab)₂-山羊抗

小鼠 IgG(H+L)(Zymed, San Francisco, CA)用 TTBS 溶液以 1: 1000 的比例稀释。再次用 TTBS 洗涤该膜三次, 然后加入 BCIP/NBT(5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐/氮蓝四唑(Sigma))。染色后, 用 TTBS 溶液除去 BCIP/NBT 溶液。Western 印迹分析的结果是, 所表达的 PBL₄ 肽能被抗 PBL₄ 血清识别。

- 5 在 ECL 情况下, 采用 PVDF 膜(Gelman Science, BioTrace[®])代替硝酸纤维素膜。另外, 第一抗体所用比例为 1: 10000, 用 HRP 偶联的家兔抗小鼠 IgG(Pierce, Rockford, IL, USA)作为第二抗体, 其比例为 1: 10000。在颜色反应中采用每 25 毫升溶液 B 有 1 毫升的 ECL+Plus Western 印迹试剂溶液 A(Amersham)。当产生足够的颜色后, 将膜插入胶片盒中在胶片上分别曝光 5、10、20 和 30 秒, 使凝胶上的条带被检测到(图 8)。
- 10 在图 8 中, 泳道 M 表示 ECL 检测标记(Gibco BRL), 泳道 1 表示 PBL₄ 肽。从图 8 的结果来看, 表达的 PBL₄ 肽能被抗 PBL₄ 血清识别。

另外, 用 Protein G 柱(Bio-Rad, USA)从家兔血清中分离出的多克隆抗体对 PBL₄ 肽进行 Western 印迹分析, 获得了相同的结果。

15 实施例 5: 抗 PBL₄ 肽小鼠抗体的制备

本文所用的 PBL₄ 肽是实施例 2 步骤 3-3 中除去了 His-尾的 PBL₄^{his} 肽。

步骤 1: PBL₄ 肽和 OVA 之间的连接

- 卵白蛋白(OVA)作为载体蛋白以 1: 10 的摩尔比加入实施例 2 步骤 2 中的纯化的 PBL₄ 肽中, 4℃下培育 1 小时。在 PBL₄ 肽的卵白蛋白溶液中加入相同体积的 2%(v/v)
- 20 戊二醛, 连续振摇并培育 1 小时。然后, 在反应混合物中加入甘氨酸直至最终浓度为 0.2M 才终止其中进行的反应。

反应后, 用 MWCO 12000-14000 透析膜(Spectrum[®], Dominguez, CA, USA)透析除去反应混合物中的其余的戊二醛-甘氨酸。

步骤 2: 对小鼠进行免疫

- 25 浓缩步骤 1 中与 OVA 相连的肽, 用来免疫小鼠。待注入小鼠的抗原量为 5 微克, 这是 PBL₄ 肽在与 OVA 相连之前的量。用相同量的佐剂乳化抗原, 以 0.2 毫升的用量注入小鼠的腹腔内。

用完全弗氏佐剂(CFA)作为第一次注射的佐剂, 不完全的弗氏佐剂(IFA)作为加强免疫的佐剂, 每隔两周免疫两次。在对照小鼠中, 注入 BSA(牛血清白蛋白)。

- 30 在最后一次注射的 5 天后, 用心脏穿刺从小鼠取 1 毫升血, 37℃下凝血 30 分钟。然后, 在 4℃、2500xg 下离心血液 30 分钟, 除去血中的凝块。对于待完全浓缩的其余的凝血剂, 4℃下培育上清液(血清)过夜, 10000xg 离心 20 分钟。将所得上清液等

份分到几个管内。待用于实验的血清 4℃ 保存，而其余的血清 -20℃ 保存。

步骤 3：用间接 ELISA 测定抗 PBI₄ 肽抗体的亲和力

用步骤 2 获得的血清来测定抗体的亲和力。将 100 微升 PBI₄ 肽分配到 96 孔微量滴定板(Flacon:预结合)的每个孔内，4℃ 下静置 6 小时或更长时间，然后用 TTBS(Tris 缓冲盐溶液，含有 0.05% 吐温 20)洗涤 3 次。在每个孔内加入 200 微升封闭液(含 1% BSA 的 TTBS)，37℃ 下培育 1 小时，然后用 TTBS 洗涤 3 次。经封闭液以 1: 10²-1: 10⁵ 比例稀释的 100 微升分离血清加入反应溶液中，37℃ 培育 1 小时，然后用 200 微升 TTBS 洗涤 3 次。将经封闭液 1: 10³ 稀释的 100 微升 HRP 相连的山羊抗家兔 IgG 抗体(Pierce, Rockford, IL)加入反应溶液中，37℃ 培育 1 小时，用 200 微升 TTBS 洗涤 3 次。将 HRP 底物试剂盒(Bio-Rad)的溶液 A 与其溶液 B 以 9: 1 的比例混合。将 100 微升的所得混合物加入反应溶液中，显色 30 分钟，然后用 ELISA reader(EL312e, Bio-Tek Ins.)(图 9)测定反应混合物在 405nm 下的吸光度。在图 9 中，确认对 PBI₄ 肽特异性的小鼠抗体可以 1000 倍的稀释度(图中的 X 轴的 3.0)用于 Western 印迹和 ELISA 分析。

15 实施例 6：利用小鼠模型的 PBI₄ 疫苗的抗肥胖效果

步骤 1：在小鼠中诱导肥胖

这里采用 5 周龄 ICR 小鼠(Korea Center for Animal Experiment Ltd., Seoul, Korea)。小鼠喂养于饲养场，温度保持在 17℃ 至 25℃，喂以混合饲料(Sam Yang Feed Ltd., Seoul, Korea, [组分：水 11.8% 以上，蛋白质 20.0% 以上，粗制脂质 10.0% 以上，粗纤维 10.0% 以上，粗制灰 10.0% 以上，钙 0.6% 以下和磷 0.4% 以上])。给予小鼠 Goldthioglucose(GTG)以诱导肥胖。GTG 在诱导腹侧正中下丘脑核(VMH)脱敏方面有一定作用。因此，给予 GTG 的小鼠不感到饱，并始终有进食的欲望。这里所用的 GTG 是非常不稳定的化合物，它很容易在水中或湿气中降解。因此，用 1 毫升芝麻油(Sigma Inc.)稀释 100 毫克 GTG(Sigma, Inc.)，并采用 Brecher 等人(Brechere G.和 Waxler, S.H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70:498-501(1949))的相同方法来给予适量的 GTG。

将小鼠分成测试组(20 只小鼠)和对照组(4 只小鼠)，将 25 毫升 GTG 注射入测试组，而对照组不注射。

在实验前测定测试组小鼠的体重，选出体重偏差不明显的小鼠用来进行实验。注射 GTG 后 1 周测得的小鼠体重在 26.5 至 29.5 克范围内。

30 注射 GTG 组的 7 只小鼠被诱发肥胖，而其余的小鼠则没有变胖。给没有诱发变胖的小鼠再次注射 GTG，然后所有的小鼠被诱发变胖。

将所有诱导变胖的小鼠分成 3 组。第二次注射 GTG 后一周，用实施例 3 步骤 2

中的方法将 PBI₄ 肽注射入由 7 只小鼠组成的测试组 1 的小鼠中。另外，在 3 组的另一组小鼠(测试组 2，有 7 只小鼠)中注射卵白蛋白代替 PBI₄ 肽作为模拟实验，还有一组(测试组 3，有 6 只小鼠)不注射疫苗以诱导肥胖。另一方面，将 0.2 毫升 PBS 注射入对照组中，与测试组比较，以确认本发明疫苗的效果。

- 5 另外，将这里所用的饲料与蛋黄混合并在 50℃ 下干燥，以诱导胆固醇的摄取，从而使小鼠血清中的胆固醇水平升高。提供足量的饲料，以引起与胆固醇水平相关的疾病。每日测定小鼠体重。

- 如图 10 所示，在注射 GTG 12 周后，测试组 1(-▲-▲-)的注射疫苗的小鼠的体重从 27.7±0.4 克增加至 52.2±1.7 克。从该数据得出结论，测试组 1 与对照组(-○-○-)之间体重增加没有显著差别。然而，肥胖后注射了卵白蛋白的测试组 2(-●-●-)和诱导肥胖后不注射疫苗的测试组(-■-■-)的小鼠体重从 28.3±0.5 克持续增加至 68.9±2.8 克。因此，确认通过注射 PBI₄ 肽疫苗能抑制肥胖。

在图 10 中，G1 和 G2 代表 GTG 注射的时间，V1, V2 和 V3 代表 PBI₄ 肽疫苗的注射时间。

- 15 图 11 显示了诱导产生肥胖的小鼠的外观。将测试组 1 的 20 周龄小鼠(图 11a: 正常小鼠)和测试组 3 的 20 周龄小鼠(图 11b: 肥胖的小鼠)相比较。如图 11 所示，确认本发明的疫苗可有效地抑制肥胖。

步骤 2: 测定血中胆固醇的水平

- 在第一次注射 GTG 后，将对照组的 12 周龄小鼠的血液胆固醇水平与测试组 1 和 2 的注射了 GTG 的 12 周龄小鼠的血液胆固醇水平比较。用 Cholestezyme-V, Triglyzyme-V, HDL-C555(Shin Yang Chemicals, Seoul, Korea)和 LDL-EX 试剂盒(Denka Bio-Research, Ltd., Tokyo, Japan)，通过酶促方法测定总胆固醇、甘油三酯、HDL-胆固醇和 LDL-胆固醇的浓度。在每个实验中，用标准的标定器-D(Denka Bio-Research, Ltd., Tokyo, Japan)获得 O.D 值的标准曲线，以减少实验误差。根据标定曲线计算出感兴趣的 O.D 值，以确认脂质的浓度和含量，其结果显示在表 1 和图 12 中。

	总胆固醇	TG	HDL-C	
对照	79±3.7	180±26	59±3.4	
测试组 1	118±3.6	217±47	92±4.7	20±1.7
测试组 2 和 3	131±8.8	218±70	119±7.5	30±4.5
TG: 甘油三酯, HDL-C: HDL-胆固醇 LDL-C: LDL-胆固醇				

如表 1 和图 12 所示，肥胖诱导的结果确证测试组的胆固醇含量没有显著差别，

序列表

5	<110>	金晓骏
	<120>	载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽，以及含有这些肽的疫苗组合物
	<130>	SJPA0103PCT
10	<150>	KR10-2000-0052055
	<151>	2000-09-04
	<160>	16
15	<170>	KopatentIn 1.71
	<210>	1
	<211>	15
20	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	载脂蛋白 B-100 的模拟肽
25		
	<400>	1
		Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala Phe
		1 5 10 15
30		
	<210>	2
	<211>	15
	<212>	PRT
35	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	载脂蛋白 B-100 的模拟肽
40		
	<400>	2
		Arg Phe Arg Gly Leu Ile Ser Leu Ser Gln Val Tyr Leu Asp Pro
		1 5 10 15
45		
	<210>	3
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
50		
	<220>	
	<223>	载脂蛋白 B-100 的模拟肽

而总胆固醇、HDL-C 以及 LDL-C 的总血液浓度少量增加(图 12)。

工业实用性

5 本发明的含有载脂蛋白 B-100 表位的模拟肽、其多联体和修饰肽的疫苗组合物能抑制肥胖的发生而不引起生物体内的自身免疫。

因此,用本发明的疫苗能比暂时性的且成本高的抑制胆固醇代谢有关酶的常规方法更有效地治疗与 LDL 有关的循环疾病。

10 尽管本发明参照其具体实施例作了特别的说明和描述,但是本领域技术人员将会理解,在不脱离所附权利要求所确定的本发明宗旨和范围内可以有各种形式和细节上的变化。

	<400>	3	
	Ser Val Cys Gly Cys Pro Val Gly His His Asp Val Val Gly Leu		
5	1	5	10 15
	<210>	4	
	<211>	23	
10	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	构建 BL 或 LB 盒的寡核苷酸	
15			
	<400>	4	
	tcgaccgtaa tgttcctcct atc		23
20			
	<210>	5	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
25			
	<220>		
	<223>	构建 BL 或 LB 盒的寡核苷酸	
30	<400>	5	
	atcattgaag ataggaggaa cattacgg		28
	<210>	6	
35	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
40	<223>	构建 LB 盒的寡核苷酸	
	<400>	6	
	ttcaatgatg tttattggat tgcattcta		29
45			
	<210>	7	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
50	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223>	构建 LB 盒的寡核苷酸	
	<400>	7	
5		agcttagaat gcaatccaat aaac	24
	<210>	8	
	<211>	28	
10	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	构建 BL 盒的寡核苷酸	
15			
	<400>	8	
		ttcaatgatg tttattggat tgcattcc	28
20			
	<210>	9	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
25			
	<220>		
	<223>	构建 BL 盒的寡核苷酸	
30	<400>	9	
		tcgaggaatg caatccaata aac	23
	<210>	10	
35	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
40	<223>	前导盒的上链	
	<400>	10	
		gatccgatga tgatgacaag atcg	24
45			
	<210>	11	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
50	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223>	前导盒的下链	
	<400>	11	
5	tcgacgatct	tgtcatcatc atcg	24
	<210>	12	
	<211>	6	
10	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
15	<223>	肠激酶切割位点	
	<400>	12	
	Asp Asp Asp Asp Lys Ile		
	1	5	
20			
	<210>	13	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
25	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	LB 盒的上链	
30			
	<400>	13	
	tcgaccgtaa	tggtcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc ta	52
35	<210>	14	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
40	<220>		
	<223>	LB 盒的下链	
	<400>	14	
45	agcttagaat	gcaatccaat aaacatcatt gaagatagga ggaacattac gg	52
	<210>	15	
	<211>	51	
50	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>		
	<223>	BL 盒的上链	
5	<400>	15	
		tcgaccgtaa tgttcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc c	51
	<210>	16	
10	<211>	51	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
15	<223>	BL 盒的下链	
	<400>	16	
		tcgaggaatg caatccaata aacatcattg aagataggag gaacattacg g	51

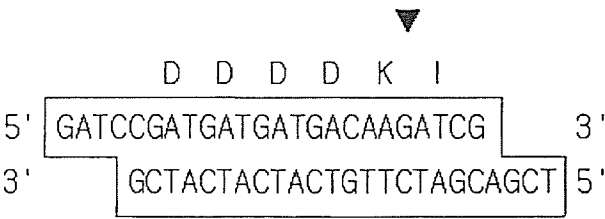


图 1a

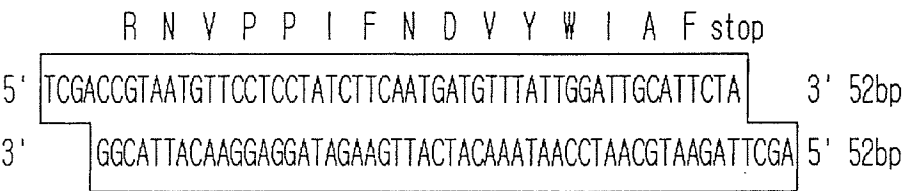


图 1b

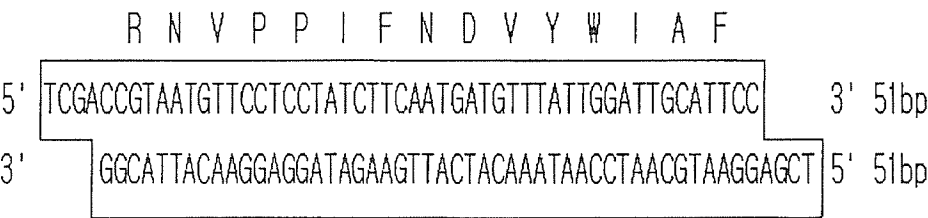


图 1c

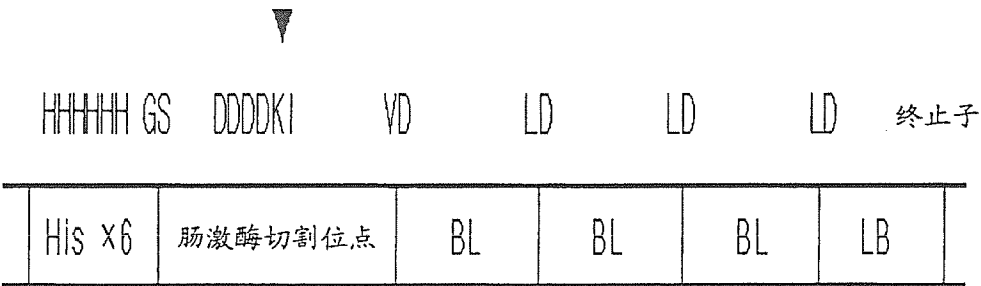


图 1d

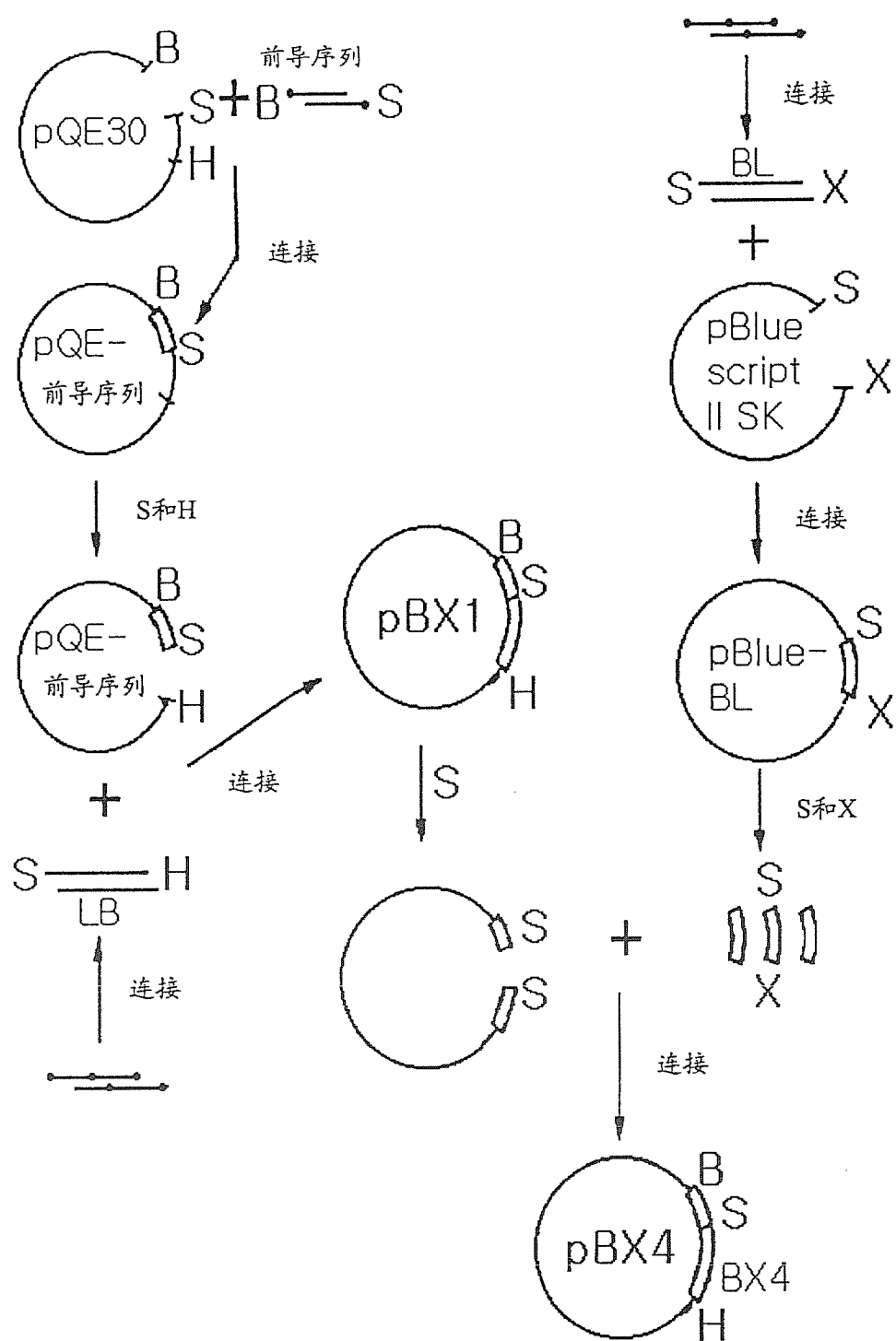


图 2

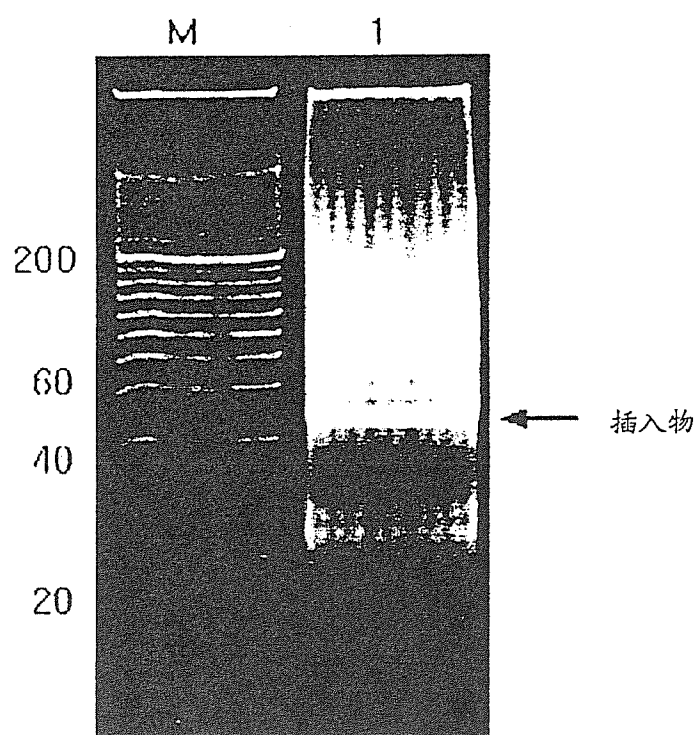


图 3

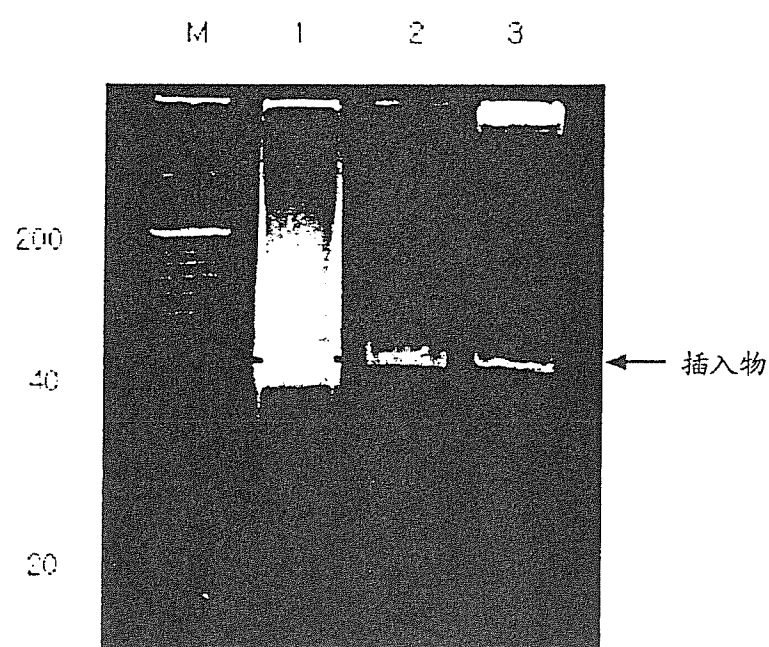


图 4

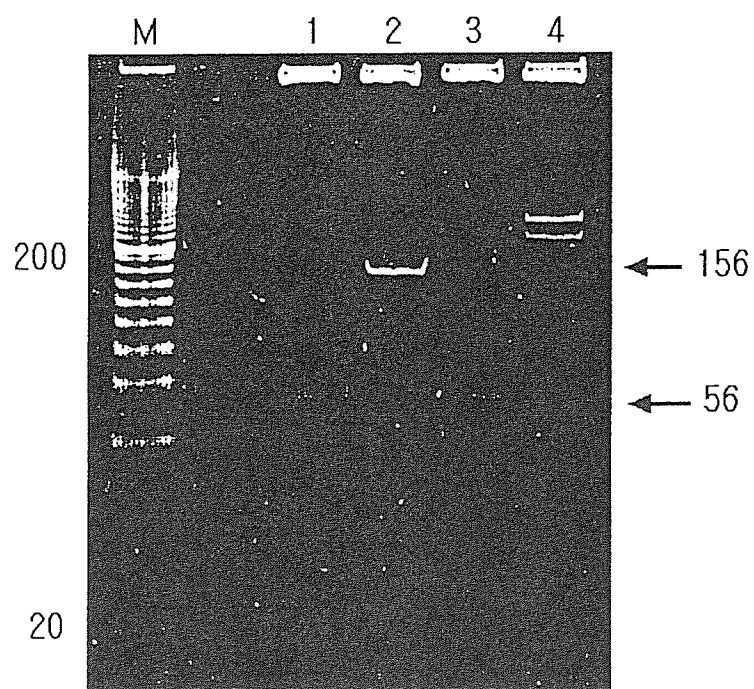


图 5

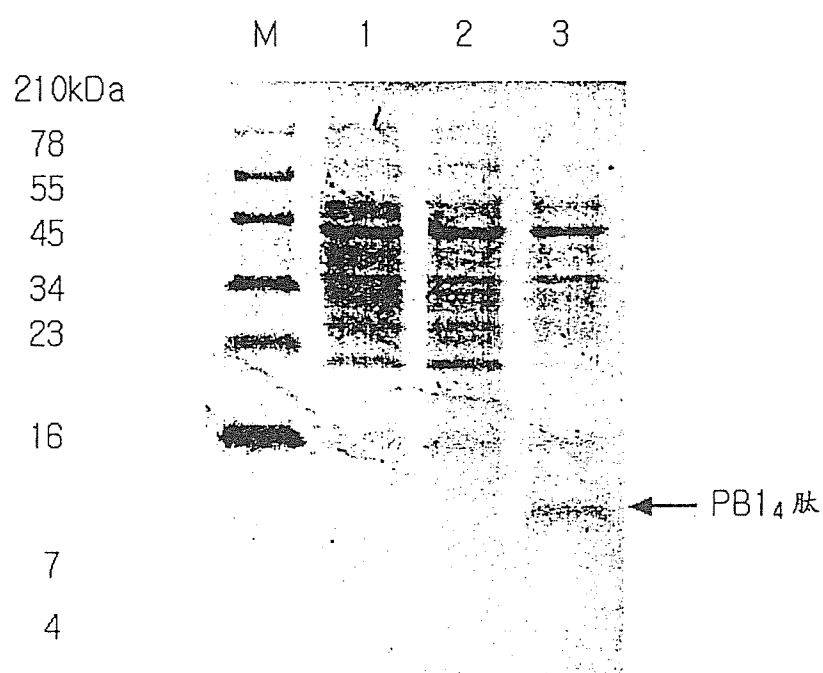


图 6

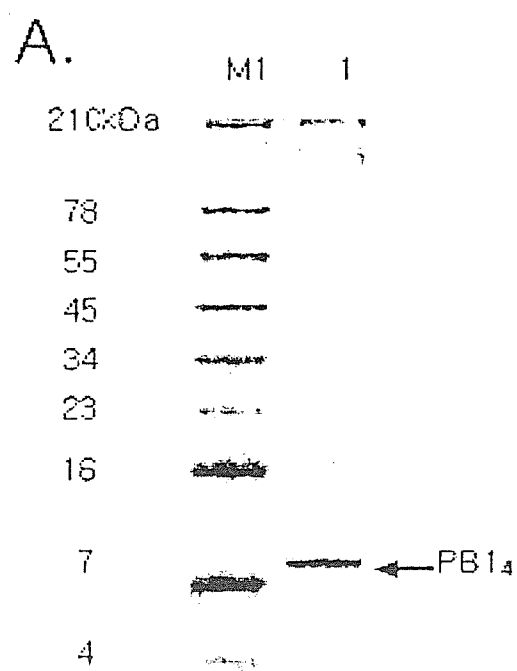


图 7

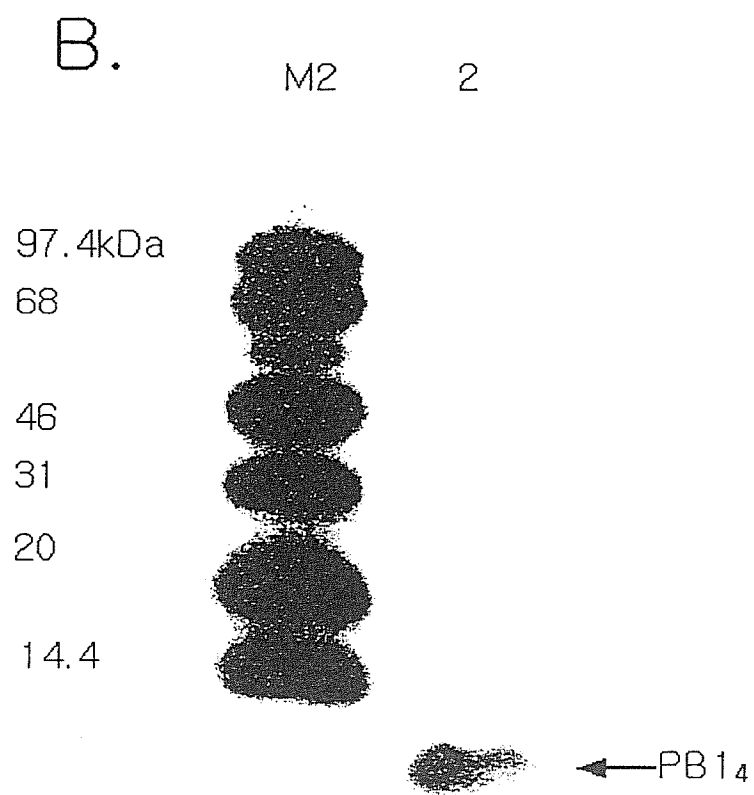


图 8

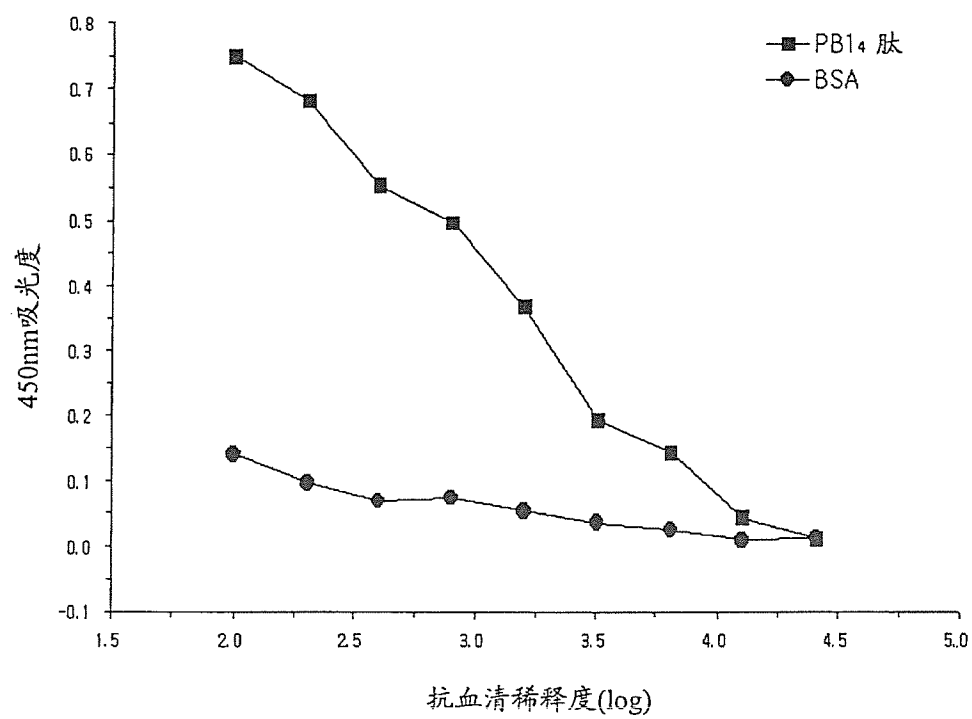


图 9

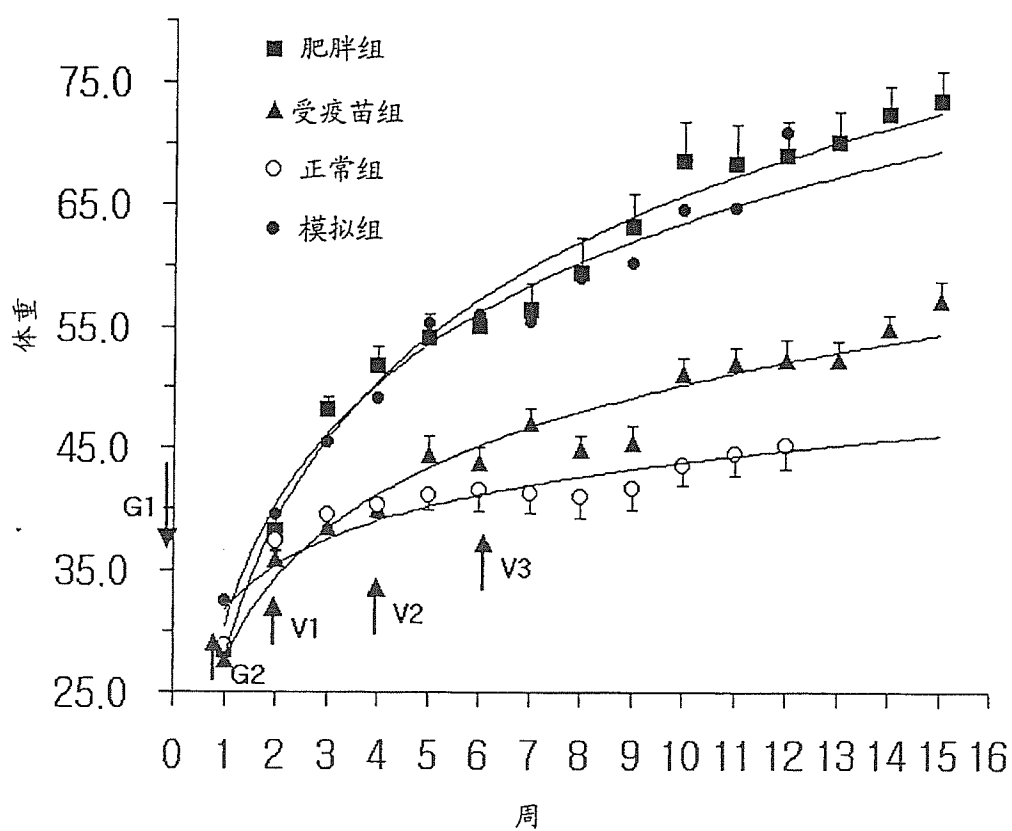


图 10

图 11a

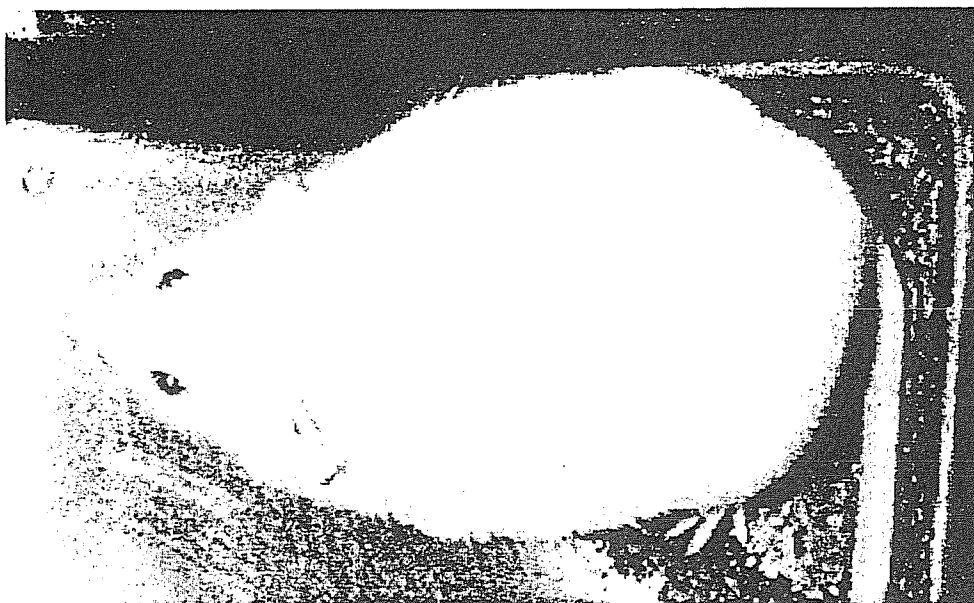


图 11b

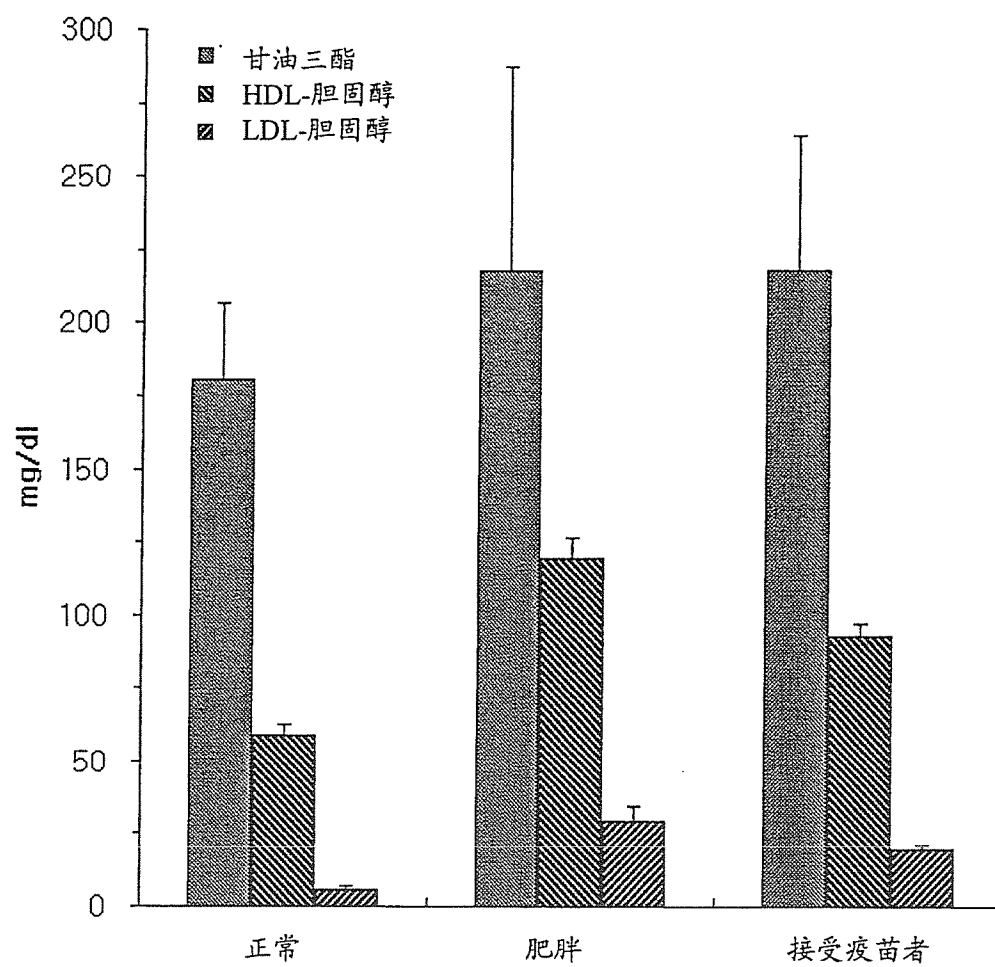


图 12